

「マウスの養育（子育て）行動とその異常：スクリーニングのためのプロトコル」

理化学研究所 脳科学総合研究センター 黒田親和性社会行動研究ユニット
大西 竜子、恒岡 洋右、黒田 公美

"What's wrong with my mouse mother-pup relationship? : Screening protocols and technical considerations"

Ryuko OHNISHI, Yousuke TSUNEOKA, Kumi O. KURODA
Kuroda Research Unit for Affiliative Social Behavior, RIKEN Brain Science Institute

サマリー

精神疾患研究においてマウスは実験モデル動物として欠かせないツールである。養育（子育て）はマウスとヒトでの対応が明らかな社会行動であり、また各種の精神疾患や青少年の心理社会的問題とも関連が深いため、マウスを用いた神経科学的研究の発展が期待される。本稿では母親だけでなく未経産メスやオスマウスの仔に対する行動についてラットとの比較を含めて概説するとともに、その実験的定量法を紹介する。

キーワード

養育行動・母性行動・Parental behavior・Maternal behavior・遺伝子改変マウス

はじめに

昨今他の実験生物学研究分野と同様、精神神経疾患研究においてもマウス遺伝子工学が普及し、一般的な手法となっている。多くの研究室で、特定の遺伝子改変マウスを作成または入手し、その表現型を調べる **Reverse genetics** を行っているであろう。その過程で、変異を持つ母マウスの仔が育たないことは比較的よく見られる現象である。

仔が生まれているのに育たない場合、子育て異常が疑われることが多く、子育てを研究している私共は相談を受けることがある。しかし、本当に子育てが悪いのか、悪いとしたらなぜなのかを明らかにするためには、仔の生育に影響を与えるいろいろな要素を一つずつ分離して検討する必要がある。本稿では、特別な行動実験用のスペースを必要とせず、一般的にマウスの飼育・繁殖に用いられる **SPF** 環境下の小さなケージで子育て行動を定量的に評価するプロトコルを紹介する。

1) マウス子育て行動の種類と概要

母性行動 **Maternal Behavior** とは「子の生存確率を高めるような母親の行動」の総称である^{1,2}。母親以外の個体による子育ては、父親であれば父性行動 **Paternal behavior**、それ以外の個体であれば **Alloparental behavior** と呼ばれる。本稿ではこれらを総称して養育行動 **Parental behavior**（親性行動とも訳される）と呼ぶ。

哺乳類の種の中で、これまで養育行動がもっともよく研究されてきたのは実験室ラット *Rattus norvegicus* およびマウス *Mus musculus* である。ラットとマウスの養育行動は共通する部分が多いが、若干の違いもある。ラットやその他の哺乳類の養育行動の詳細については文献^{1,2}を、養育異常が報告されている遺伝子改変マウス系統および本稿の補足情報については拙著³を参照されたい。

1) -1 出産に伴う母性行動

マウスの仔は出生時には目が見えず、運動機能も未熟で自分で移動することができない。また、生後1週間は毛が生えておらず、体温調節機能も未発達である。そのため、ほ乳をはじめ、身体を清潔に保つ、保温する、外敵から身を守るといった様々な事柄を親からの養育に依存している。これらの養育行動の諸要素（下記下線部）を仔の出生前後の時間軸に沿って説明する。

出産前にはじまる行動

巣作り Nest building: 成獣マウスは明瞭な巣 (Sleeping nest) を作り、排泄する場所と巣を区別する。出産数日前になると、母マウスはさらに大きく深い巣を作るようになる (Brood nest)⁴。巣材となる柔らかい材料を集め、紙片を噛み砕いてふわふわにする行動も活発になる。仔が生後 2 週を越えると、母親の巣作り行動は次第に減退する。巣作り行動の評価は 3)-2 参照。

出産時の行動

母親マウスは一腹 4~9 匹の仔を、約 10 分毎の間隔で 1 匹ずつ出産する。1 匹産むごとに、母親は仔の身体をなめることで羊膜と羊水を取り除くと共に、臍帯と胎盤を食べる (胎盤食 Placentophagia)⁵。これらの組織は粘着性があるため、胎盤食が不十分な場合、仔の皮膚に残った羊膜に床敷がくっついたり (図 2)、臍帯同士がからまって何匹もの仔がもつれあったままになる場合もある。出産時の仔なめ行動には仔の呼吸を刺激する機能もある。

出産後の行動

出産と胎盤食が終了すると、母親はすべての仔を一か所に集め、出産時の活動によって壊れた巣を作り直し、この上にまたがって授乳・保温する。

レトリービング Retrieving (仔を巣に運び入れる行動): 仔が何らかの事情で巣外に出た場合、母親は仔をくわえて巣に連れ戻す⁶。通常の飼育環境では生後 2 週目よりこの行動は減衰するが、仔が穴に落ちたような場合には、生後 3 週目でも母親はレトリービングしようとする (吉田ら、投稿中)。レトリービング行動の定量は 3) -4、4) を参照。

仔をまとめる行動 Grouping: 巣の中で仔同士が接触しあうまできちんとまとめる行動を指す。巣がきちんとタイトに作られていれば、最後の仔を運び入れた時点ですべての仔同士が接しあうので、レトリービングに含めて捉えられる場合も多い。

仔をなめる行動 Licking: 母がすばやく舌を動かし、仔をなめる行動である。とくに会陰部をなめる Anogenital licking は身体の他の部位に対してよりも多く行われ、仔の排泄を促進する重要な役割がある^{7 ii}。

授乳 Nursing: 母親マウスが乳首を仔に露出する姿勢でじっとすると、仔は嗅覚と触覚を頼りに乳首を捜し、吸乳する。授乳姿勢はラットで詳細に記載されている⁹。もっとも授乳意欲が高いのは Kyphosis (Arch-backed nursing や High crouch ともいう) で、母親は四肢をぴんと伸ばし、体幹をアーチ状に反らせて持ち上げた姿勢を維持する。その結果、腋窩と鼠径部にある乳首が十分に露出し、母親の腹側にスペースがでけるため、多くの仔が同時に吸乳できる。この姿勢は産後 1 週目に最も多く見られ、その後、減衰する。Hovering (Low crouch) では体幹の緊張度が低く、腹側のスペースが小さくなるⁱⁱⁱ。Passive or prone position は母親が四肢で体重を支えず、仔の上に腹ばいになったり、横向きに寝転がったりする姿勢である^{iv}。

仔を守る行動 Protection of the young: げっ歯類の母親は仔を外敵や外界の危険から守るため、仔を隠す、警戒発声、敵を攻撃したり、おびき寄せるといった様々な行動を取る。実験室環境ではその機会はないが、見知らぬ同種個体をケージに導入することにより、母親が侵入個体を攻撃する行動 (Maternal aggression) を観察・定量できる¹⁰。

1) -2 母親以外による養育行動

未経産メスマウスは初めて仔に暴露しても 30 分以内に何らかの養育行動を示すことが多い^{11, 12 v}。巣作りやレトリービングに要する時間は連日の仔の養育経験により、短縮する。

オスマウスの仔に対する行動は系統や実験条件によって大きく異なる^{16, 17}。脳科学研究でよく用いられる C57BL/6 系統では半数以上の未交尾オスが仔を喰殺する (vom Saal らで 70 %, 私共では約 80 %)^{vi}。しかし、オスをメスと同居させ、交尾・妊娠が起こると、オスの喰殺は次第に抑制される。さらに仔が生まれ父親となると、実仔だけでなく非血縁の仔に対してもレトリービングや巣作りなどの養育を行うようになる²¹。

1) -3 養育行動の実験的定量

上述の 7 種の養育行動はすべてラット・マウスで定量可能である^{22, 23}。中でもレトリービング行動は測定が容易で、かつ母親以外の個体や不妊を示す変異マウス系統でも測定できるため、広く養育行動の指標として用いられる (eg. ^{24, 25})。以下では、巣作りとレトリービングを中心にした簡便なマウスの養育行動の定量方法を紹介する。

2) マウス子育て行動の定量のためのマウスの繁殖

2) -1 行動実験に用いるマウスの産生法

ここでは例として、一般的な常染色体劣性遺伝の遺伝子破壊 (ノックアウト) マウスの養育行動試験について述べる。伴性変異、優性遺伝、Parent-of-origin 変異などの場合はそれぞれに応じて交配方法などを

適宜変更する。

1. ヘテロ接合体(+/-)(10-12 週齢)のメス 1~3 匹と、(+/-)のオス (12-24 週齢) 1 匹を入れた交配ケージを作る^{vii}。予備的な検討から注目する遺伝子変異が完全劣性 (つまり(+/-)の表現型が(+/+)と同じ) で、かつホモ接合体(-/-)オスに交配能があれば、(+/-)メスと(-/-)オスの間での交配によって実験群(-/-)と対照群(+/-)を繁殖してもよい。
2. 繁殖成績に応じ、実験用に週齢のそろった(-/-)と対照群の(+/+)または(+/-)のメスを 6~8 匹程度獲得できるように、複数の交配ケージを作る^{viii}。
3. 妊娠兆候の見られたメスは単独のケージに移し、毎朝出産確認を行う。
4. 仔は生後、一定の日数が経過した時点で離乳させ、行動実験まで同性グループ飼育する^{ix}。
- 5a. 仔の養育に関する試験を成獣の未産マウスで行う場合、試験の 2 日前から観察対象のマウスを単独飼育する。私共は給排気・自動給水設備付のシステムケージ(265 mm x 205 mm, 140 mm 高)を使用しており、これに床敷として精製パルプのチップ^xをカップ 1 杯 (約 250 ml)、巣材^{xi}として綿パッド(Nestlet、米国 Ancare 社)を 1 片 (5 cm x 5 cm)入れて行動観察用ケージとし、そこに被検マウスを 1 匹入れる^{xii}。原則として行動実験終了後まで、ケージ交換は行わない。
- 5b. 分娩後の母性行動を観察する場合、2) -2 の方法に従って交配し、妊娠メスを単独飼育とする。可能な範囲で交尾後からの日数をそろえて単独飼育に移す方がよい。

2) -2 産後の母性行動試験にむけた交配の方法

1. 初産メスの母性行動試験の場合^{xiii}、10-12 週齢まで待ってから交配を始める。(+/+)の対照群メスを(-/-)のオスと、(-/-)の実験群メスを(+/+)オスとそれぞれ交配する。すると全ての仔は(+/-)となり、仔の遺伝子型の影響を最小限にして母親の遺伝子型の影響を調べることができる。(-/-)オスが不妊であれば、次善の策として(+/-)オスと交配する。いずれの場合も仔の遺伝子型が(-/-)にならないようにする。母性行動の評価自体には不要だが、交配後数日間、早朝に膣栓の有無を確認すると、出産予定日やメスの性行動についての情報が得られる。
2. 妊娠兆候が確認できたら、前述のパルプの床敷と巣材を入れた観察用ケージに移す^{xiv}。
3. 授乳開始後 1 週間は、母親を刺激しないようケージ交換を避ける。床敷が非常に汚れた場合、分娩前後を避けて汚れた部分だけを手で取り除き、同量の新しい床敷を入れる。

3) マウス養育行動試験のプロトコル

母親のストレスをできるだけ少なくするため、下記に説明する順番で観察を行う。また可能な限り母親はケージ外に出さない²²。レトリビング試験や仔の観察の際に母親が仔の上にまたがっている時は母親が移動するのを待つか、母親の尻を優しく押して仔から離れるよう誘導することにより、母親をケージ外に出したりつまみあげたりせずに仔を取り出すようにする。

3) -1 出産の確認

出産が近づいたら毎日、暗期の終了から 2 時間以内に分娩の有無を確認する。私共の飼育室は 08:00-20:00 が明期なので、毎朝 10 時までに出産時の観察を行っている。この理由は、経験的に朝 10 時を過ぎると、仔のミルク摂取が不足している場合、仔は衰弱してくる。すると正常な母親でも養育意欲を失い、場合によっては仔を喰殺しはじめるため、仔の死因鑑別が不可能になるからである。仔を里親につける場合でも、午後になると仔が衰弱して里親に拒絶されるため、仔の救命はほぼ不可能になる。

出産時、母親はケージ内を歩き回り、会陰部や仔をリッキングするなどして絶え間なく動いている。明期であってもこのような行動が続いて出産中のようなのであれば、ケージには触れず、下記の観察は最後の仔を出産して 1 時間ほど待ってから行う。出産が終了すれば母親は落ち着いて胎盤食を完了し、出産時に乱れた巣を直して仔を集め、授乳を始める。

3) -2 巣作りの評価^{xv}

ケージの外から巣を観察し、下記の 5 段階の点数をつける^{xvi}。単独飼育の場合は 1-2 点、出産後は 2-3 点となる個体が多い (図 1A 参照)。

0 点: 巣が作られていない、あるいは巣材が無秩序に散乱し、巣がどこか特定できない。

1 点: 平坦でまともにも悪いが、巣がどこかはわかる。

2 点: 底の浅いスプ皿状³¹の巣。

3 点: 連続した土手状構造をもち、内側はくぼ地になった巣 (「不完全ドーム・半球状」³¹)

4 点: 「完全ドーム」³¹の巣。紙片を噛み砕いてふわふわにし、これを用いて巣の周囲・上下とも完全に囲つ

たものであり、外からは仔は全く見えない^{xvii}。

3) -3 仔をまとめる行動（グルーピング）の評価

ケージの外から観察し、巣の位置を基準にして仔の所在、他の仔との位置関係を記録する。この段階では、「巣の中で3匹生存、2匹死亡」とか、「数匹は死亡して巣材の中、1匹は巣の外で生存」といった簡単な記述で十分である。すべての生存仔達が巣の中で互いに接している状態が正常である。仔が巣の外にいたり、床敷に埋もれていた場合（透明なケージの底から覗くと分かりやすい）は、仔の状態（「ピンク色で活発」「青白く弱っている」「死亡」など）を可能な範囲で記載し3) -5項で確認する。衰弱・死亡した仔を巣外に放置したり喰殺したりするのは異常行動ではない。

3) -4 レトリーピング試験

まず、静かにケージの蓋を開け、巣にいる中で元気そうな仔をすばやく、巣をできるだけ乱さないように3匹取り、巣から離れた三隅に1匹ずつ仔を置いて、そっと蓋をする。10分間観察を継続し、次に示す潜時を記録する。

- スニッフィング：最初に仔に近づいて匂いを嗅ぐまでの時間^{xviii}
- レトリーピング：それぞれの仔を巣へ連れ帰るまでの時間
- グルーピング：巣の中の仔達を一箇所に集め終えるまでの時間
- クラウチング：仔達を寄せた後に、その上に継続して1分またがるまでの時間

仔を巣以外の場所へ運んだり、巣へ運ぶ途中に落としたりといったこともあれば記録しておく。母親がすべての仔をレトリーピング、グルーピングし、その上で1分間クラウチングした場合を「完全母性行動 Full maternal behavior」と呼ぶ^{xix}。行動の一部が行われた場合（例えば1~2匹だけをレトリーピングしたり、レトリーピングはしないが仔の周りに巣材を集め、クラウチングするなど）、「部分的養育行動 Partial maternal behavior」、仔の匂いを嗅ぐもしくは舐めるだけでレトリーピングもクラウチングもしない場合、「無応答 Nonresponding」とする。また仔を噛むなど攻撃（多くは仔の導入から数分以内で、仔は鳴声を上げる）が見られた場合には、すぐに全ての仔をケージから取り出し、傷ついた個体は安楽死させる³²。この行動は「喰殺 Infanticide」と分類する^{xx}。C57BL/6系統では稀であるが、多くが無応答や部分的養育であった場合、30分のレトリーピング試験を翌日も繰り返し、仔に対する反応の変化を調べる^{24, 35}。通常、行動は養育か喰殺かに二極化していく。C57BL/6成獣マウスが2日間連続して完全養育を行った場合、その後、無応答や喰殺になることは稀である。

生後当日の仔達は自力で巣に移動することはできない。従って、最初に出産後のケージ内を覗いたときにほとんどの仔が巣の中にいたなら、それは母親のレトリーピングが行われた間接的証拠である。それにも関わらず、この試験で母親のレトリーピングが不完全であれば、実験によって母親がストレスを受けた可能性が考えられる。その場合、10分の観察後にケージを静かに元の飼育棚（より暗い環境）に戻し、15分間追加で観察する。もし、母親がレトリーピングを再開すれば、はじめのレトリーピング不足の原因は養育意欲自体の低下よりもストレス脆弱性や不安感受性増大による二次的な影響が考えられる。

体表面に胎仔組織や血液が付着している、胃内のミルクが少ない、体温が低く衰弱しているなどの仔はレトリーピングを誘発しない。実仔がこのような状態の場合、他の母親の健康な仔（生後0-3日齢、身体はきれいでミルクを十分飲み温かい、できれば遺伝的背景が同じ）を代わりに用いて試験を行う。弱った実仔を放置したり、噛んだりしていた母親でも、健康な仔を与えられるとただちに正常なレトリーピングを示し、養育意欲自体に問題はないことがわかる場合がある^{xxi}。

3) -5 仔の観察

上述の観察が終了したら、すべての仔をケージから取り出し、生死や胃内のミルクの量、羊膜・臍帯が仔の体表面に残っていないかどうかなどを記録する（図1A、矢頭）。粘液質の胎仔組織が多く残存していると、巣材が肌にくっついて容易にとれなくなる（図1A、*）。また、噛まれた傷がないかも調べる（ごく軽い傷は四肢末端や尾に多い、極端な例は図1B）。仔が食べられている場合、仔の死体の一部が床敷の中に埋もれていないかも調べる。

3) -6 母親の身体の評価

仔の腹部にミルクバンドが見られないときは、母親の乳頭に吸われた痕跡があるかどうかを調べる。仔が吸乳していたなら、腹側の短い体毛に覆われた皮膚から乳首がやや飛び出して見える（妊娠・授乳していないメスと比較するとわかりやすい）。母乳分泌が不良で仔が飢えて必死に吸乳を続けていると、乳首の先端が過剰に伸びて出血が見られることもある。いずれにせよ、乳頭が伸びるほど仔が吸乳するためには、母親が授乳姿勢を取ることが必要である。母親がクラウチングを行うかどうかと合わせ、乳首の状態は授乳を行ったかどうかに関する重要な情報となる。

これらの母親の乳頭や会陰部の観察の際も、尾をつまんで完全に空中にぶらさげるとストレス反応が誘導

され、後に自ら巣を破壊したり、仔を攻撃することもある。そこで、尾を持って後足を宙に持ち上げるが、前足はケージの底もしくはカバーにつかまらせたままですばやく観察を行う。また同時に母マウスの膣開口部に残存胎仔や出血（分娩異常を示唆）が認められるかを観察する。

3) ー7 結果の解釈

図2のフローチャートに従う。上記の流れに沿って繁殖から観察までを行えば、仔の要因のために子育てが阻害されることはないはずである。母親要因についても、養育意欲以外に母乳の出具合、健康状態、分娩障害の有無、仔が少なすぎるなど、結果的に養育を阻害する様々な要素が鑑別される。経験上、C57BL/6の遺伝的背景では変異系統の母乳分泌不良が多く見受けられる。これは野生型での母乳分泌能があまり高くないため、若干の健康状態の悪化によっても、非特異的に母乳が不足するためと考えられる。

4) 母親以外のマウスのドナー仔に対する行動の評価

この実験はドナー仔マウスの手配さえできれば、被検マウスを個飼いにし、その翌～翌々日30分間のレトリビング試験を行うだけなので、非常に簡便である。出産に伴う身体的な負荷や内分泌系の変動などのConfounding factorもないため、産後の母親の養育行動試験より、むしろお勧めである^{xxii}。

1. 被験マウスを実験前の2日（少なくとも24時間）前から、2) ー1で述べた巣材と床敷を入れた行動実験用ケージで個別飼育する^{xxiii}。
2. 試験当日、3) ー2と同様に、巣の質を記録する。
3. 生後1-6日齢の元気なドナー仔を巣から離れた三隅に1匹ずつ置く^{xxiv}。そして3) ー4と同様に、スニッフing、各仔のレトリビング、グルーピング、継続して1分間クラウチングするまでの潜時を記録する。ただし、観察は10分間ではなく30分間行い、この間に上記のすべてが行われた場合、「完全養育行動」と分類する。
4. 30分後、仔を取出し、疑わしい場合には身体に噛傷が残っていないかを調べる^{xxv}。

5) より詳細な行動の観察

レトリビング行動はマウスやラットの養育のモチベーションを比較的良好に代表している。しかし、レトリビングは正常でクラウチングや巣作り行動が阻害される場合もある³⁷（恒岡ら、投稿を準備中）。そこで、レトリビング以外の養育行動についても評価する方法を紹介する^{xxvi}。3) ー4と同様に被験マウスのケージにドナー仔を3匹導入し、レトリビングの潜時などを記録しつつ、同時に15秒に1回、マウスの行動を30分間記録していく（図3）^{xxvii}。記録項目は、巣作り(N)、リッキングまたはスニッフing(L)、クラウチング(C, H)、巣内にいるが何もしない(I)、仔に対する以外の行動（採餌中、毛づくろい、探索行動など）(O)である。最終的に各行動が観察された回数を集計し、行動を評価する^{xxviii}。

6) おわりに

児童虐待などの不適切養育は成人後のストレス脆弱性、行動障害、抑うつ・不安神経症などのリスクを高める可能性がある³⁸⁻⁴¹。すべての哺乳類の子は生存に親の養育を必要とするので、養育行動に関わる基本的な神経回路は哺乳類種間で進化的に保存されていると考えられる。従って、マウスモデルを用いて養育行動の分子神経機構が明らかになれば、将来的に人間における親子関係とその問題の理解・支援に貢献できるであろう。本稿がその一助となれば幸いである。

プロフィール

大西竜子：2000年大妻女子大院卒（食物栄養学）。恒岡洋右：2009年茨城大院卒（サムライアリの社会行動生態学）。黒田公美：2002年阪大院卒、McGill大及び理研脳センターでのポストドクを経て、2008年より現職。本稿へのご意見やマウスの子育てに関するお問い合わせは、oyako@brain.riken.jpまでお気軽にお寄せ下さい。親子関係の脳神経機構の解明に興味のある大学院生・若手研究者を歓迎しております。

文献

1. N. A. Krasnegor, R. S. Bridges, *Mammalian parenting: biochemical, neurobiological, and behavioral determinants*. (Oxford UP, New York, 1990), pp. 502.
2. M. Numan, T. R. Insel, *The neurobiology of parental behavior*. (Springer-Verlag, New York, 2003), pp. 418.
3. K. O. Kuroda et al., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **35**, 1205 (Jul 1, 2011).

4. E. M. Weber, I. A. Olsson, *Applied Animal Behaviour Science* **114**, 1 (2008).
5. M. B. Kristal, *Neurosci Biobehav Rev* **4**, 141 (Summer, 1980).
6. J. S. Rosenblatt, *Science* **156**, 1512 (Jun 16, 1967).
7. R. F. Ewer, *Ethology of mammals*. (Plenum, New York, 1968), pp. 418.
8. D. Liu *et al.*, *Science* **277**, 1659 (Sep 12, 1997).
9. J. M. Stern, J. S. Lonstein, *Prog Brain Res* **133**:, 263 (2001).
10. J. S. Lonstein, S. C. Gammie, *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 869 (Dec, 2002).
11. E. Noirot, in *Advances in the Study of Behavior* D. S. Lehrman *et al.*, Eds. (Elsevier, New York, 1972), vol. 4, pp. 107-145.
12. J. S. Lonstein, G. J. De Vries, *Neurosci Biobehav Rev* **24**, 669 (Aug, 2000).
13. R. S. Bridges, *Physiol Behav* **14**, 245 (Mar, 1975).
14. R. S. Bridges, in *Parental care: Evolution, mechanism, and adaptive significance*, J. S. Rosenblatt, C. T. Snowdon, Eds. (Academic press, San Diego, 1996), pp. 215-242.
15. A. Fleming *et al.*, in *Parental care: Evolution, mechanisms, and adaptive significance*, J. S. Rosenblatt, C. T. Snowdon, Eds. (Academic press, 1996).
16. S. Parmigiani *et al.*, *Neurosci Biobehav Rev* **23**, 957 (Nov, 1999).
17. K. O. Kuroda *et al.*, *Brain Res* **1211**, 57 (2008).
18. R. L. Trivers, in *Sexual selection and the descent of man 1871-1971*, B. Campbell, Ed. (Aldine-Atherton, Chicago, 1972), pp. 136-172.
19. S. B. Hrdy, *Folia Primatol (Basel)* **22**, 19 (1974).
20. S. Parmigiani, F. S. vom Saal, Eds., *Infanticide and parental care*, (Harwood academic publishers, 1990), pp. 496.
21. F. S. vom Saal, L. S. Howard, *Science* **215**, 1270 (Mar 5, 1982).
22. J. S. Lonstein, A. S. Fleming, *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 8**, 8.15.1 (Feb, 2002).
23. F. Capone *et al.*, *Current protocols in toxicology* **13**, 1 (2005).
24. J. R. Brown *et al.*, *Cell* **86**, 297 (Jul 26, 1996).
25. B. K. Lucas *et al.*, *Endocrinology* **139**, 4102 (Oct, 1998).
26. J. N. Crawley, *Whats wrong with my mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. (Wiley-Liss, New York, ed. 2nd, 2007).
27. D. Francis *et al.*, *Science* **286**, 1155 (Nov 5, 1999).
28. J. N. Crawley, *Neuron* **57**, 809 (Mar 27, 2008).
29. T. J. L. R. Manual. (2009).
30. K. Hamaguchi-Hamada *et al.*, *Neurosci Res* **48**, 259 (2004).
31. S. E. Hess *et al.*, *J Am Assoc Lab Anim Sci* **47**, 25 (Nov, 2008).
32. G. Perrigo *et al.*, *Behav Genet* **23**, 525 (Nov, 1993).
33. G. Perrigo *et al.*, *Humane Innovations and Alternatives in Animal Experimentation* **4**, 208 (1990).
34. G. Perrigo *et al.*, *Anim. Behav.* **38**, 897 (1989).
35. Z. Wang, D. R. Storm, *Neuropsychopharmacology* **36**, 772 (2011).
36. C. P. Leblond, *Proc Soc Exp Biol Med* **38**, 66 (1940).
37. J. S. Lonstein, J. M. Stern, *J Neurosci* **17**, 3364 (May 1, 1997).
38. J. Bowlby, *Maternal care and mental health*. (World Health Organization, Geneva, 1951).
39. M. Rutter, *Maternal deprivation reassessed*. (Penguin, Harmondsworth, 1972).
40. M. J. Meaney, *Annu Rev Neurosci* **24**, 1161 (2001).
41. H. F. Harlow, *The human model: Primate perspectives*. (V.H. Winston & Sons, Washington D.C., 1979).

図1 産後の養育行動異常の例 (FosB KO)

Fig 3A 左上段は FosB (+/+), 左下段は FosB (-/-)メスの出産当日の巣の状態。上段の巣は3点、下段は1点である。右側は(+/+)と(-/-)の出産後の仔の状態。青い矢印はミルクバンド（胃内の母乳が透けて見えるもの）、黒矢頭は残存した胎盤、*印は胎仔組織に付着した巣材を示す。

Fig. 3B は、ある FosB (+/-) 母親の出産当日に見られた仔の噛傷。上段の5匹は発見時に生きており、下段の5匹は死亡、部分的に食べられていた。真ん中のパネルは上段の右から3匹の頭部の噛傷、最下段の図は下段もっとも右側の死仔の頭部を示す。この母親の巣は0点であり、ミルクバンドが見られた仔はいなかった。しかし、胎盤食は正常に行われていることに注意。

図2 出産後の養育行動評価のためのフローチャート

フローチャートの順序通りに行動観察を行うわけではないことに注意！まずは3)に示した順序ですべての情報を収集する。その後、このフローに従って評価を行う。

図3 詳細な行動観察記録の一例

1st Ret: 仔を最初に巣に運び込んだ時間。2匹目3匹目は同様に2nd, 3rd Ret.

脚注

- ⁱ ラットやマウスは、自分の仔と同じ日齢の非血縁の仔を区別せず、ほぼ同様に養育する。仔に馴染みのない匂いがついて拒絶することもあるが、仔をしばらく里親の床敷でくんでおくことを受け入れやすくなる。
- ⁱⁱ ラットでは養育の指標としてリッキングの観察定量がよく行われる⁸が、マウスは小さいため母親の舌や舐めている部位を観察するのは難しく、厳密な定量はあまり行われない。
- ⁱⁱⁱ マウスにもラットでの記載がほぼあてはまるが、マウスでは **Hovering** と **Kyphosis** の区別はやや難しい。
- ^{iv} 上記では授乳中の姿勢をクラウチングという語を用いて分類しているが、クラウチング自体は仔にまたがる姿勢を指し、子の保温など授乳以外の機能ももつ。授乳できない未経産メスやオスでもクラウチングを行う。
- ^v 未経産メスラットは初めて仔に接すると、むしろ回避的行動を取り、数日間連続して仔に慣らさなければ子育てを開始しないことが多い (**Pup sensitization**)。しかし、一度母親となると、離乳後もほぼ生涯にわたり、仔に対して高い養育モチベーションを保持する (**Maternal memory**)¹³⁻¹⁵。
- ^{vi} 未交尾オスの喰殺行動は飢えやストレスのせいではなく、必ずしも食べるわけではない。マウスやライオン、ヒヒなど、複数のメスがリーダーのオスと交尾し繁殖するような種においては、リーダーの交代に伴い、新しいリーダーオスが群内の旧リーダーの仔を喰殺する行動がしばしば見られる。これはメスの授乳を中断させることで性周期を早く復活させ、交尾と実仔の繁殖を可能にする適応的な行動である^{18,19}。新リーダーオスの喰殺行動は、その種の在胎期間の終わり頃に一致して見られなくなることから、喰殺から養育への行動変化が実仔を殺すことがないように正確に制御された生殖戦略であることがわかる²⁰。なお、オスラットでは連続して1週間以上仔への暴露を行うことにより、養育に転じる傾向があるが、未交配マウスでは喰殺が必ずしも減少しない。
- ^{vii} 養育時の環境因子の違いや遺伝的浮動 **Genetic drift** などの混交要因を最小限にするため、同腹の仔同士を比較するように実験群と対照群を作成する²⁶。そのため(-/-)と(+/-)のマウスを実験群として生産する際は、(+/-)のオスとメスの間で交配する。(-/-)がほとんど正常であっても、(-/-)と(+/-)のコロニーを独立に交配・維持するのは望ましくない。仔の将来の母性行動は、自らが母親から受けた養育行動に影響される²⁷ことにも注意。また、トランスジェニック系統の維持は変異体オスと野生型メスの交配で行うのが一般的である。しかし、例えば父親側から変異が伝達された場合にのみ表現型が出る **PEG** 遺伝子群では、変異体のメスと野生型のオスを交配する。注目する変異が優性で生存や生殖に有害な場合には、系統の凍結胚保存を初期の段階で行い、継代回数を制限する。
- ^{viii} 行動実験の統計処理には、通常各実験群につき10~20匹が必要である²⁸。しかし、一度に実験を行うよりも、各群5匹程度で1回目の小規模の実験を行い、行動に違いがありそうなら同じ実験を追加するのが実用的である。別コホートで再現されれば、結果の信頼性も高まる。コホート間で統計的に差がなければ、最終的にデータを混合して統計解析してよい。
- ^{ix} ジャクソンラボラトリー社と同様、私共は **C57BL/6J** 系の遺伝的背景のマウスは3週齢ではまだ発達が十分でないと考えられるため、4週齢で離乳している²⁹。
- ^x おが屑や木材チップの床敷は、養育行動に影響を与え得る^{17,30}。少なくとも **fyn** 欠損マウスでは、ヘキサナール（植物に含まれる草のような臭気の揮発性物質）が、養育障害の原因物質である。木材片の床敷は生産の季節やロットによって使われる木の種類が変動する上、オートクレーブや防腐剤の添加などの処理方法により、ヘキサナールなどの化学成分の種類や量が変わるため、嗅覚が鋭敏なマウスの行動実験を正確にコントロールすることが難しい。私共はこうした不確定要因を除外するため、行動実験には品質の安定した精製パルプを床敷に使用している。
- ^{xi} 巣材を与えると巣の位置と形状が定量しやすい。巣材は綿球などでもよいが、**Nestlet**（ネストレット）という製品は板状に圧縮した綿繊維で、扱いやすく機能的にも優れている。成獣マウスは1~2日以内に、この **Nestlet** を噛み裂いてふわふわにし、巧みに巣を作る。もし **Nestlet** が裂かれておらず、原形を留めていたら、そのマウスには不正咬合など健康上の問題があるか、または巣作り行動の重大な欠陥が疑われる。
- ^{xii} 床敷が多い方がマウスは巣作りしやすいが、これ以上入れると換気給水装置に不具合が起こることがある。
- ^{xiii} **C57BL/6J** 純系では野生型でも母乳の出がよくなく、コホートによっては初産の3割以上にも及ぶ母親で仔が全滅することがある。この場合、同じマウスの二産目、三産目において、同様の記録を行う必要がある。
- ^{xiv} 妊娠メスは尾でぶらさげず、尾を指で軽くはさんで手の平にマウスをのせ、愛護的に移動させる。
- ^{xv} 本稿では既報に基づき³¹、マウスの養育行動に関するその他の測定も併せて行えるように単純化した方法を紹介する。
- ^{xvi} ひとつのケージに巣が複数ある場合は、各々の巣について評価する。実験室ラットでは仔の数が乳首の数よりも多い場合、母親は巣を2つに分けて、交互に授乳する場合がある (**Split litter**)。しかし、**C57BL/6J** マウスでは乳首の数 (10) よりも多い仔を生むことは稀であり、**Split litter** はめったにみられない。
- ^{xvii} この4点滴の巣を作るには多くの床敷と巣材が必要であり、今回紹介している方法では稀である。
- ^{xviii} マウスの養育行動は嗅覚に大きく依存するため、仔に対するスニフing潜時の記載は重要である³。スニフingの遅延は、健康不良や嗅覚障害を示唆する。
- ^{xix} 完全母性行動の定義は文献により、若干の違いがある。
- ^{xx} 未交尾 **C57BL/6** オスなど、相当の率で喰殺が起こることが明らかな場合には、仔の犠牲を減らすために、次のような方法もある。まず単独飼育開始時に、小さな金網の容器（紅茶漉しなど）をケージに入れておく。実験開始時、仔を金網容器に入れてケージの中に戻す。観察対象のマウスが目を細め、興奮して尾を持ちあげたり、打ちつけたりしながら、激しく容器に噛みつき始めたら、このマウスは喰殺を行う可能性が極めて高い。このような攻撃の兆候が見られなければ、仔を容器から出してケージに導入し、そこから改めて養育行動を観察する^{33,34}。
- ^{xxi} 実験用に他の仔を代用するのであれば、正式には対照群の母親に対しても他のメスが生んだ仔を用いてレトリビングの評価を行い、実験条件を均一にすべきである。
- ^{xxii} 未経産メスによる養育行動は、マウス³⁶でも、ラット⁶でも、下垂体・卵巣ホルモンに依存しない。

^{xxiii} マウスを一ヶ月も継続して単独飼育するとストレスの誘因になり、特にオスの場合には他の個体に対して攻撃的になることもあるので²⁶、実験に使用するまではグループ飼育とし、2週間以上単独飼育をしない。床敷交換が必要な場合も行動試験より2日前までに行う。

^{xxiv} 仔に体毛が生えてくると、レトリービング反応を誘発する程度は弱くなる。^{xxv} C57BL/6 系統では稀であるが、多くが無応答や部分的養育であった場合、30分のレトリービング試験を翌日も繰り返し、仔に対する反応の変化を調べる^{24,35}。通常、行動は養育か喰殺かに二極化していく。観察対象のマウスが2日間連続して完全養育を行った場合には、その後、無応答や喰殺になることは稀である。

^{xxvi} ラットを用いた先行研究⁸での方法をマウス用に一部改変。

^{xxvii} 経時的にすべてを記録しようとする、記録が観察に追い付かない。15秒に1回の観察を行う上記の手法には、複数のマウスを同時に観察記録できるという利点もある。ビデオ撮影による記録では一方向のみでの観察になるため、巣内で行われている行動がわかりにくく、結局は現場での直接記録よりも解析に時間がかかることが多い。

^{xxviii} マウスは仔の導入直後はリッキングや巣作りを多く行い、時間が経つにつれて、よりクラウチングを行う傾向がある。そのため、特にクラウチングの評価に重点を置く場合には、仔の導入直後の30分だけでなく、さらに30分後に追加観察を行うとよい。ケージの一方からの観察だけでは十分に行動を区別することが難しい場合もあるので、可能であれば巣を後ろや下からも観察できるように、最初にケージを観察台から少しずらしておくといよい。